

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-157275

(43)Date of publication of application : 13.06.2000

(51)Int.Cl. C12N 15/09
 C07K 14/195
 C07K 16/12
 C12N 1/21
 C12P 21/02
 C12P 21/08
 G01N 33/15
 G01N 33/566
 //(C12N 15/09
 C12R 1:19)
 (C12N 1/21
 C12R 1:19)
 (C12P 21/02
 C12R 1:19)

(21)Application number : 10-
 331585

(71)Applicant : NAKAMURA
 GIICHI
 RRF
 KENKYUSHO:KK

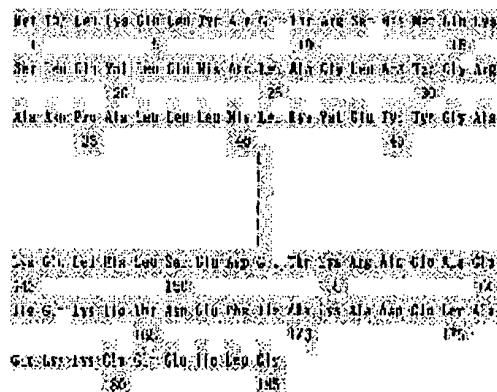
(22)Date of filing : 20.11.1998 (72)Inventor : NAKAMURA
 GIICHI

(54) RIBOSOME RECYCLING FACTOR GENE OF HIGHLY THERMOPHILIC BACTERIUM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new protein of ribosome recycling factor (RRF) of highly thermophilic bacterium, having a specific amino acid sequence, capable of performing a three-dimensional structural analysis of the RRF required for a medicine-creating system of an antimicrobial agent targeting the RRF.

SOLUTION: This new ribosome recycling factor(RRF) of highly



thermophilic bacterium comprises a protein having an amino acid sequence of the formula, or an amino acid sequence having one or plural substitution, deficiency, addition and/or insertion of amino acid residues in the amino acid sequence of the formula, and further having a heat-resistant protein having ribosome cycling factor activities. The RRF can be easily crystallized, and is useful as a sample or the like for carrying out three dimensional structural analysis required for development of an antimicrobial agent targeting the RRF. The protein is obtained by expressing a gene obtained by screening a genome library of extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* by using a probe having a partial sequence of the RRF gene in a host cell.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-157275
(P2000-157275A)

(43)公開日 平成12年6月13日(2000.6.13)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/195		C 0 7 K 14/195	4 B 0 6 4
16/12		16/12	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	C
審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 19 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願平10-331585	(71)出願人	598160661 中村 義一 東京都練馬区田柄2丁目22番11-307号
(22)出願日	平成10年11月20日(1998.11.20)	(71)出願人	598160672 株式会社アール・アール・エフ研究所 茨城県つくば市観音台1丁目25番地14号 久光製薬株式会社 筑波研究所内
		(72)発明者	中村 義一 東京都練馬区田柄2丁目22番11-307号
		(74)代理人	100102978 弁理士 清水 初志 (外1名)
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 高度好熱菌リボソームリサイクリングファクター遺伝子

(57)【要約】
【課題】高度好熱菌のリボソームリサイクリング因子(RRF)遺伝子と、この遺伝子によってコードされるタンパク質の提供。
【解決手段】高度好熱菌である*T. thermophilus*に由来するRRF遺伝子、この遺伝子がコードするタンパク質、ならびにそれらの用途を提供する。本発明によるRRFは、185個のアミノ酸で構成される分子量20994 Daのタンパク質で、安定性にすぐれ、容易に結晶化することができる。結晶化RRFにより、CARDを利用したRRFをターゲットとする抗菌剤の創薬システムに必要なRRFの3次元構造解析が可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 2】 請求項 1 のタンパク質を構成するアミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列を有し、かつ耐熱性であるリボソームリサイクリングファクター活性を有するタンパク質。

【請求項 3】 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、耐熱性であるリボソームリサイクリングファクター活性を有するタンパク質。

【請求項 4】 請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 5】 配列番号：1 の塩基配列を持つ請求項 4 の DNA。

【請求項 6】 請求項 4 または 5 に記載された DNA が挿入されたベクター。

【請求項 7】 請求項 4 または 5 に記載された DNA を発現可能に保持する形質転換体。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 9】 請求項 4 または 5 に記載の DNA と特異的にハイブリダイズする DNA であって、少なくとも 14ヌクレオチドの鎖長を持つ DNA。

【請求項 10】 オリゴヌクレオチドが配列番号：3、配列番号：4、および配列番号：5 で構成される群から選択された塩基配列を含む、請求項 9 の DNA。

【請求項 11】 請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。

【請求項 12】 次の工程を含む、抗生物質活性を持つ化合物の設計方法。

a) 配列番号：2 に示すアミノ酸配列で構成されるタンパク質を結晶化する工程

b) 結晶化タンパク質の 3 次元構造を決定する工程 c) 3 次元構造における活性部位を決定する工程

d) 活性部位にフィットする化合物を検索する工程

【請求項 13】 次の工程を含む、リボソームリサイクリングファクター活性の阻害物質のスクリーニング方法。

i) 配列番号：2 に示すアミノ酸配列で構成されるタンパク質、またはその活性部位を含む断片を候補化合物と接触させる工程

ii) 配列番号：2 に示すアミノ酸配列で構成されるタンパク質、またはその活性部位を含む断片と結合した候補化合物を選択する工程

【請求項 14】 候補化合物が請求項 12 の方法によって設計された化合物である請求項 13 の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、細菌のリボソームリサイクリングファクター (Ribosome Recycling Factor; 以下、RRF と記載する) に関する。

【0002】

【従来の技術】 細菌のタンパク質合成最終段階に関わる因子 (RRF; リボソーム・リサイクリング・ファクター、Kaji a. et al., Disassembly of the post-termination complex and reduction of translational error by ribosome recycling factor (RRF) - A possible new target for an antibacterial agents, Biochem. Biophys. Res. Commun. 250:1-4, 1998) は、細菌の増殖に必須のタンパク質である。タンパク質合成の最終段階では、完成したペプチドがペプチジル tRNA から遊離する反応が起き、終止コンプレックスと呼ばれる複合体が生じる。タンパク鎖の翻訳開始ステップ (第 1 ステップ)、タンパク鎖延長ステップ (第 2 ステップ)、そしてタンパク鎖合成終止ステップ (第 3 ステップ) に続くこの段階は、リボソームリサイクリングステップ (第 4 ステップ) と呼ばれている。終止コンプレックスは、mRNA、tRNA、そして 70s リボソームから構成されている。RRF は、終止コンプレックスを構成している各要素をばらばらにして再びタンパク質合成に利用可能な状態とする機構を支えるタンパク質である。RRF は一連の作業をタンパク鎖延長因子である EF-G (elongation factor-G、あるいは translocase)、ならびに GTP と協力して行っている (Hirashima A. et al., Factor-dependent release of ribosomes from messenger RNA. Requirement for two heat stable factors. J. Mol. Biol. 65:45-38, 1972)。

【0003】 RRF が関与するタンパク質合成の第 4 ステップは、細菌と真核生物とでは機構が異なっている。たとえば、細菌においては RRF は必須だが、真核生物においては必須ではない。したがって、RRF 阻害物質は細菌に対して選択毒性を示すものと期待される。また RRF はすべての病原細菌に存在している。更にこれまでに明らかにされた RRF の構造を比較すると、アミノ酸配列レベルで 40-60% 程度のホモロジーを有し、各細菌に固有の RRF が存在する。したがって、個々の微生物に特異的な RRF 阻害剤を実現できる可能性が有る。このような背景から、現在 RRF は抗生物質の新しい標的因子として注目されている。RRF の阻害は、細菌の生理学的状況により、致命的または増殖抑制的に働き、RRF の阻害機構は他のタンパク質合成阻害とは全く異なることが明らかにされてきた (Janosi L., Evidence for in vivo ribosome recycling, the fourth step in protein biosynthesis, EMBOJ. 17:1141-1151, 1998)。このように、RRF を選択的に阻害する物質は、従来から存在する抗生物質とは全く異なる新しい抗菌剤となることが期待される。

【0004】 ペニシリンの発見以来、人類は数多くの抗生物質を手にした。そして抗生物質は感染症治療に大き

く貢献し、結核や赤痢などの伝染病を克服してきた。抗生物質の登場で人類は、細菌感染との戦いに勝利したとまで言われたこともあった。しかしながら、高齢化が進み、高度医療の進展による感染のハイリスク者が増加している昨今、抗生物質に耐性を持った薬剤耐性菌の出現と拡大が懸念されている。例えば、既に克服されたと思われた結核菌も再び耐性病原菌として台頭しつつある。黄色ブドウ球菌等にも薬剤耐性を持つ菌 (MRSA; methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) が増加している。また、MRSAに対する唯一の特効薬と考えられていたバンコマイシンにも、低感受性のMRSAの存在が報告され始めている。その他、バンコマイシン耐性腸球菌 (VR *

Aquifex aeolicus

(Deckert G. et al., *Nature*, 392:353-358, 1998)

Bacillus subtilis

(Kunst F. et al., *Nature*, 390:249-256, 1997)

Escherichia coli

(Ishikawa S. et al., *J. Biol. Chem.* 264:20054-20059, 1989)

Haemophilus influenzae

(Fleishmann R. D., et al., *Science*, 269, 496-512, 1995)

Mycobacterium leprae

(Eiglmeier K. et al., *Mol. Microbiol.* 7 (2):197-206, 1993)

*Staphylococcus aureus*等

(GenBank Locus AF033018 ;Accession AF033018)

【0006】以上のような微生物に由来するRRFは、結晶化することが難しく、いくつかの微生物からRRFの遺伝子が単離され組み換えタンパク質としてRRFが回収されるようになっているのにもかかわらず、RRFの結晶化は未だに成功していない。一般にタンパク質の結晶化におけるタンパク質分子の安定性は、結果を左右する重要な要素の一つである。公知のRRFにおいては、結晶化に必要な安定性の維持が困難なため、結晶化が遅れている。

【0007】現在ではタンパク質の活性中心の解析や反応機作の予測といった作業にコンピューターを利用したCARDD (Computer Aided Rational Drug Design) が実用的なレベルで活用されるようになり、こうした創薬工程が飛躍的に効率化されつつある。CARDDによる創薬システムにおいては、ターゲットとなるタンパク質の3次元構造解析データが重要な情報となる。X線構造解析による3次元構造解析には、解析試料として多量の結晶化タンパク質が必要である。また同様にNMRによる3次元構造解析にも多量の純粋なタンパク質が必要である。X線結晶構造解析およびNMRによる構造解析は、タンパク質の3次元構造を明らかにするための主要な方法である。X線結晶構造解析では、X線にさらされる結晶試料は損傷しやすいため十分な情報を得るためには多くの結晶が必要である。NMRにおいても、試料として1mM程度を越える濃度を要求することから、やはり純粋なタンパク質が多量に求められる。したがってRRFにおいても、CARDDに

*E; vancomycin resistant enterococcus) の拡散も心配されている。

【0005】こうした状況の中で、既知の抗生物質とは全く異なった作用機序で病原微生物に作用するRRF阻害剤を作り出すことは、閉塞状況にある薬剤耐性菌対策を開拓する有効な手段である。しかしこれまでにRRF活性阻害剤についての報告は無い。一方RRF阻害剤のスクリーニングに必要な細菌のRRFとしては、これまで図1にまとめたような微生物に由来するものが公知である。すなわち以下のような微生物については、RRF遺伝子の存在が確認されている。

よる創薬システムに基づいて阻害物質の開発を進めるには、RRFの結晶化が必要である。更にターゲットとなっているRRFタンパク質の活性中心や他の反応構成成分との相互作用を再現し、創薬を進めていくには、単一の分子のみならず、終止コンプレックス、ERF-G、あるいはGTPといった実際の反応を構成する他の成分との関係を明らかにしていかなければならない。そのためには、より結晶化しやすく、しかもNMRにおけるピーク帰属が容易なRRFタンパク質の提供が望まれる。しかしながら、前述のとおり公知のRRFはいずれも結晶化が困難で、またNMR解析においてもピーク帰属が困難なタンパク質であり、CARDDに必要な情報を与えるものではなかった。

【0008】またRRFの安定性は、生化学的な手法によるRRFの阻害物質スクリーニングにおいても問題となるケースがあった。一般的なスクリーニング方法においては、ターゲット因子であるRRF、あるいはその活性部位を構成する断片に対して結合性を有する物質がスクリーニングの対象となる。RRFに対して候補化合物を接触させて結合活性を示すものを選択する実験が行われるが、RRFの安定性が不十分な場合には効率的なスクリーニングが行えなくなるのである。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、結晶化しやすく、機器による3次元構造解析の容易なRRFの提供を課題とする。更には、結晶化の容易なRRFを利用したRRF阻害物質のスクリーニング方法をはじめとするRRFの用

途の提供を課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、高度好熱菌にRRFを求めれば、結晶化が容易なRRFを得ることができるのではないかと考えた。高度好熱菌のタンパク質は、高温で安定であるのみならず常温でも高度な安定性を備え、酸やアルカリ、あるいはタンパク質変性剤に対しても安定な場合が多く結晶化が容易であることが期待された。また、同様に3次元構造を解析する手段であるNMRスペクトルの計測においても、昇温が可能であることからスペクトルピークがシャープな解析しやすいデータを与えることが期待された。そのためピーク帰属が容易になり距離情報などの3次元構造を解析するために必要な情報を容易に入手できるようになると考えた。本発明者らは、このような考え方に基づいて高度好熱菌として75℃を増殖至適温度とする*Thermus thermophilus*を選択した。一方で、公知のRRF遺伝子の塩基配列比較に基づいて保存性の高い領域を選択して、これをプローブ、あるいはプライマーとして利用することにより高度好熱菌RRF遺伝子のクローニングを行い本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のRRF遺伝子、RRFタンパク質、ならびにそれらの用途に関する。

【0011】〔1〕配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

〔2〕〔1〕のタンパク質を構成するアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および/または挿入したアミノ酸配列を有し、かつ耐熱性であるリボソームリサイクリングファクター活性を有するタンパク質。

〔3〕配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、耐熱性であるリボソームリサイクリングファクター活性を有するタンパク質。

〔4〕〔1〕～〔3〕のいずれかに記載〕のタンパク質をコードするDNA。

〔5〕配列番号：1の塩基配列を持つ〔4〕のDNA。

〔6〕〔4〕または〔5〕に記載されたDNAが挿入されたベクター。

〔7〕〔4〕または〔5〕に記載されたDNAを発現可能に保持する形質転換体。

〔8〕〔7〕に記載の形質転換体を培養する工程を含む、〔1～3のいずれかに記載〕のタンパク質の製造方法。

〔9〕〔4〕または〔5〕に記載のDNAと特異的にハイブリダイズするDNAであって、少なくとも14ヌクレオチドの鎖長を持つDNA。

〔10〕オリゴヌクレオチドが配列番号：3、配列番号：4、および配列番号：5で構成される群から選択された塩基配列を含む、〔9〕のDNA。

〔11〕〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のタンパク質

に結合する抗体。

〔12〕次の工程を含む、抗生物質活性を持つ化合物の設計方法。

a) 配列番号：2に示すアミノ酸配列で構成されるタンパク質を結晶化する工程

b) 結晶化タンパク質の3次元構造を決定する工程

c) 3次元構造における活性部位を決定する工程

d) 活性部位にフィットする化合物を検索する工程

〔13〕次の工程を含む、リボソームリサイクリングファクター活性の阻害物質のスクリーニング方法。

i) 配列番号：2に示すアミノ酸配列で構成されるタンパク質、またはその活性部位を含む断片を候補化合物と接触させる工程

ii) 配列番号：2に示すアミノ酸配列で構成されるタンパク質、またはその活性部位を含む断片と結合した候補化合物を選択する工程

〔14〕候補化合物が〔12〕の方法によって設計された化合物である〔13〕の方法。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明者らが単離した高度好熱菌RRFは、185個のアミノ酸から構成される、分子量20994 Daのタンパク質である。そのアミノ酸配列は配列番号：2に示すとおりであり、ゲノムにおいては配列番号：1に示した塩基配列によってコードされている。本発明によるRRFの活性は、大腸菌TF1001のようなRRFの欠損株を利用した相補試験に基づいて確認することができる。RRFの欠損株は、PIファージを利用したヒドロキシルアミンによる局所的な突然変異誘発に基づき実施例に示すような方法によって得ることができる。まずMG12025株のようなテトラサイクリン耐性Tc^rマーカーがRRF遺伝子と約50%のco-transduction頻度を示す変異株からPIファージを調製する。得られたPIファージをヒドロキシルアミン処理後に大腸菌へ感染させる。テトラサイクリン耐性の形質導入コロニー(transductant)を選択し、テトラサイクリン添加プレートで高温致死性のコロニーを単離する。得られた変異体のうち、野生型のRRF遺伝子のみを持つプラスミドで形質転換したときに、高温で生育の回復するものがRRF欠損変異体である。RRF欠損株を用いた相補試験は、次のような原理に基づいている。すなわち、活性を確認すべきタンパク質をコードするDNAの翻訳領域のみを挿入した発現ベクターで前記RRF欠損株を形質転換する。形質転換体が高温条件下での生育を回復するとき、その遺伝子が欠損していたRRFを相補した、つまりRRF活性を持っているものと見なすことができる。

【0013】本発明は高度好熱菌RRFの機能的に同等なタンパク質にも関する。機能的に同等なタンパク質とは、RRF活性を備え、かつ耐熱性を有するタンパク質を含む。本発明において、耐熱性とは、60℃で加熱してもなおRRF活性を失わないことと定義される。大腸菌等に

由来する公知のRRFは、60℃の加熱により不可逆的に失活する。この性質を利用して、一般に好熱菌タンパク質（特に翻訳関連の）の精製においては次のような条件で熱処理が広く行われている。すなわち、0.8M NaCl、0.15M MgCl₂、50mM Tris-HCl (pH7.5)の溶液において、60℃10分間加熱したときに、耐熱性のタンパク質は変性しないが、大腸菌等に由来するタンパク質はアグリゲートを形成して低速の遠心分離により除去される (Vysotskaya et al., Eur. J. Biochem. 223:437-445, 1994, Davydova et al., FEBS Letters, 369:229-232, 1995)。本発明における機能的に同等なタンパク質は、公知のアミノ酸の変異導入方法によって得ることができる。たとえば部位特異的な変異導入方法 (di Cara E. 1998, Site-specific analysis of mutational effects in proteins. Adv. Protein Chem. 51:59-119, Mendel D., et al., 1995, Site-directed mutagenesis with an expanded genetic code. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 24:432-62, Profy A. T. et al., 1988, Complementary use of chemical modification and site-directed mutagenesis to probe structure-activity relationship in enzymes. Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol. 35:1-26) によって、配列番号：2に示すアミノ酸配列中の希望するアミノ酸を変更し、天然型の高度好熱菌RRFと同等の機能を持つタンパク質を得ることができる。変異体のRRF活性は、前記のような方法によって確認される。

【0014】本発明による高度好熱菌RRFの機能的に同等なタンパク質は、配列番号：1に示す塩基配列を持つDNA、あるいはその断片に対して相溶性の高いDNAを単離することによって得ることもできる。すなわち本発明は、配列番号：1に示す塩基配列を含むDNAとハイブリダイズするDNAによってコードされるタンパク質であって、高度好熱菌RRFと機能的に同等なタンパク質をも含む。ハイブリダイゼーションの条件としては、特異的なハイブリダイゼーションを達成可能なストリンジェントな条件を選択する。具体的には、6×SSC、50%ホルムアミド、42℃でのハイブリダイゼーション、0.2×SSC、50℃での洗浄という条件を示すことができる (J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, eds. Molecular Cloning: A laboratory Manual Second Edition, Chapter 9, Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor)。これらの条件は限定されるものではなく、同様のストリンジェンシーを与える条件は当業者が適宜設定することができる。このような方法に基づいて単離される本発明によるRRFと機能的に同等なタンパク質をコードするDNAは、配列番号：1に示す塩基配列と高い相同性を示す。具体的には、塩基配列レベルで望ましくは50%以上、より望ましくは60%以上のホモロジーを有する。

【0015】本発明は、これらの高度好熱菌RRFならびにその機能的に同等なタンパク質をコードするDNAに関

する。本発明のDNAは、cDNA、ゲノムDNAの他、合成DNAであることもできる。これらDNAは、本明細書の開示に基づいて当業者に公知の方法によって単離することができる。具体的には、配列番号：1に示す塩基配列を持つDNA、あるいはその断片、それらに相補的なRNA、更にcDNA配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチド等を³²P等で標識し、高度好熱菌のゲノムやcDNAのライブラリーをスクリーニングすることができる。あるいは、高度好熱菌のゲノムをターゲットとしてPCRを実施し、RRFをコードする遺伝子を直接増幅することもできる。PCRによるクローニングには、次のような塩基配列を持つプライマーを用いることができる。

センスプライマー（配列番号：9）：5'-ATGACCCCTGAAGGAGC TTTACGCG-3'

アンチセンスプライマー（配列番号：10）：5'-TCAGCC CAGGATCTCCTGCTCCTT-3'

配列番号：1に示した塩基配列を持つDNAは、高度好熱菌である *Thermus thermophilus* のゲノムライブラリーから得られたものである。先に述べたようにRRFは細菌に一般的に存在するとされたタンパク質であるが、高度好熱菌で単離された報告はない。

【0016】本発明に基づいて得られたRRFをコードするDNAは、組み換えタンパク質の生産に利用することができる。たとえば配列番号：1に記載した塩基配列を持つDNAを適当な発現ベクターに挿入すれば、本発明による高度好熱菌RRF発現ベクターを得ることができる。この発現ベクターで適当な宿主を形質転換し、形質転換体を培養することによって高度好熱菌RRFを発現させることができる。発現産物を回収して精製すれば、本発明による高度好熱菌RRFを純粋な組み換えタンパク質として得ることができる。宿主が大腸菌 (*Escherichia coli*) の場合、発現ベクターには、プラスミドベクター pET30a

(Novagen社製)、pGEX (Pharmacia社製)、あるいは pTYB1 (New England Biolab社製) 等が用いられる。大腸菌の形質転換は、Hanahan法や電気穿孔法等の公知の方法 (Hanahan D. et al., Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. Methods Enzymol., 1991, 204:63-113) に基づいて行われる。組み換えタンパク質は、N末端やC末端にヒスチジン残基等のタグを結合した融合タンパク質の形で発現させ、このタグを介して親和性樹脂に結合させることによって精製することができる。融合タンパク質から目的のRRFを分離するには、トロンビン、血液凝固因子Xa等のプロテアーゼで切断する。あるいは、pTYB1を用いた場合のようにタグがインテインを含む場合はdithiothreitolなどで還元条件として切断する。アフィニティクロマトグラフィーによる精製を可能とする融合タンパク質には、ヒスチジンタグの他にグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、キチン結合ドメイン (CBD)、マルトース結合タンパク (MBP)、あるいはチオレドキシン (TRX) 等も公知である。GST融合タン

パク質は、GST親和性レジンによって精製することができる。宿主が分裂酵母シゾサッカオマイセス・ボンベ(*Shizosaccharomyces pombe*)の場合には、プラスミドベクターpESP-1 (Stratagene社製)等が用いられる。酵母の形質転換には、スフェロプラスト法(A. Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 1929, 1978)や酢酸リチウム法(H. Ito et al., *J. Bacteriol.* 153, 163, 1983)等が利用される。宿主には微生物細胞の他に昆虫細胞を利用することもできる。昆虫細胞を用いた組み換え体の生産には、バキュロウイルスベクターpBacPAK8/9 (クロンテック社製)等が用いられる。組み換え体の生産には、CHO細胞、HeLa細胞、あるいはCOS7細胞のような哺乳動物細胞を利用することもできる。これらの宿主においてはpMSG (クロンテック社製)等のベクターが用いられる。哺乳動物細胞の形質転換は、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、電気穿孔法等(W. A. Kcown et al., *Methods for introducing DNA into mammalian cells. Methods Enzymol.* 185, 527-537, 1991)が利用される。

【0017】精製された本発明による高度好熱菌RRFは、結晶化しX線結晶構造解析のための試料とすることができる。結晶化は、蒸気拡散法や透析法等の公知の方法に基づいて行われる。タンパク質の結晶化には、タンパク質の純度、温度、pH、あるいは共存する添加物等の様々な要素が影響を与える。本発明の高度好熱菌RRFは、高度な安定性を持つことから、一連の操作を通じて構造が安定に保持されるため、結晶化を容易に行うことができる。こうして得られた結晶化高度好熱菌RRFを利用し、X線結晶構造解析によって3次元構造の解析が行われ、最終的には3次元構造が決定される。更に、タンパク質そのものの3次元構造のみならず、RRFがリボソーム、rRNA、mRNA、あるいはEF-Gとの相互作用の結果として生じる3次元構造の変化についての解析も可能となる。

【0018】RRFの3次元構造解析は、以下のように行われる。タンパク質などの生体高分子の結晶構造解析の手順は、純粋なタンパク質を数mg以上精製することから始まって、結晶化、X線回折強度データ収集、各回折斑点の位相決定、電子密度計算、分子モデル作成、構造の精密化と続く。タンパク質構造解析を行うための主要な設備として、結晶化用インキュベーター、双眼顕微鏡、X線回折計、3次元コンピュータグラフィックス装置などが必要である。具体的にタンパク質の結晶を作製する実験過程は、タンパク質を大量に(数mg以上)精製する段階、結晶が得られる条件を広く検索する段階、X線解析に適した良質の結晶を得る段階に分けられる。

【0019】まず、結晶化のためには非常に多くの条件を検索しなければならない。従って、大量のタンパク質が必要である。このためにタンパク質の大量発現系の構築が必須である。結晶になるものの多くは溶液状態では単分散であり、多分散のものは大体において結晶化しな

いので、得られたタンパク質について、光散乱装置によってタンパク質溶液の単分散性を判定し、試料が結晶化に適しているかどうかを検討する。

【0020】結晶化条件の検索は、市販のスクリーニング試薬を使用して広い範囲で行うことができ、1つの条件に1~2%濃度のタンパク質溶液を1~2 μ Lずつ使用して検索する。こうして微結晶などが得られた場合には、さらに条件を精密化する。具体的には、結晶化を行う温度、使用した沈殿剤濃度、pHなどの条件を最適化する。以上により得られた結晶を用い、X線回折強度測定を行う。最近では、結晶を細い糸の輪などですくって液体窒素温度に急速冷却してそのまま低温で測定する方法が定着しつつある。回折X線の強度測定にはイメージングプレートなどの2次元検出器によって行う。X線を当てながら結晶を回転させることで発生する多くの回折線をイメージングプレートに記録し、記録された回折強度をレーザーを当てることにより読み取る。

【0021】次に遺伝子組み換え技術を使用するか、あるいは重原子ソーキング法や共結晶化法により重原子同型置換体を調製する。これを使用して多重同型置換法(MIR法)によりタンパク質結晶の位相を決定する。この他、重原子を導入する代わりに、複雑の波長のX線による回折強度データに基づいて位相を決定する多波長異常散乱法(MAD法)も利用できる。さらに似た構造の分子が既に解析されている場合には、その分子構造を結晶中にあてはめて初期構造を得ることができ、これをもとにフーリエ合成図を描き、残りの部分を見つけだして構造を精密化して全構造決定に至る分子置換法(MR法)も利用できる。

【0022】位相が上記の方法で決定したならば、これより電子密度を求める。この精度は、反射の数(分解能)と使用した反射の精度による。分解能は使用する反射の最小面間隔で表し、少なくとも2.8 Å程度の分解能が原子位置の決定には必要とされている。この電子密度図から分子モデルを組み立てる。分子モデルを組み立てると原子座標が得られるので、これより構造因子の計算値を求め、この大きさを観測値に近づける最小自乗法により原子パラメータの精密化を行う。このようにして妥当な構造を得るようにしている。同様に精製された本発明による高度好熱菌RRFは、NMRによる立体構造解析の試料にも利用できる。NMRによる測定も数mg程度のタンパク質が必要となるために、大腸菌などを用いた大量発現系の確立が必須である。測定試料は1 mM 程度の水溶液(90% H_2O , 10% D_2O)を400 μ L用いる。この際試料のpH、イオン強度などを変化させて至適条件を見つけだす。次に実際に測定を行いNMRシグナルがどの原子核由来であるかシグナルの帰属を行う。帰属の方法はいくつかの2次元、3次元、4次元NMRスペクトルを使用する組織だった戦略が確立されている。NMRスペクトルの中には、核オーバーハウザー効果(NOE; Nuclear Overha

user Effect)、スピン結合などタンパク質の構造決定に有用な情報が多数含まれている。NMRスペクトルを多次元表示することにより、例えばプロトン核間の距離情報を反映したNOE交差ピークを一望に鳥瞰することができ、シグナル帰属に基づき溶液中のタンパク質のプロトン間距離を見積もることができる。2点間の距離からそれぞれの3次元座標を求める方法をディスタンス・ジオメトリ法と呼び、NMRの場合の立体構造計算はNOEから得られた距離情報などをもとにこの方法で計算を行うものである。

【0023】NMRの場合はX線結晶解析の場合とは異なり、近距離(5 Å以内)情報の積み重ねにより決定される。具体的には安定同位体標識タンパク質を用いて、 ^1H - ^{15}N 2次元HSQC(Heteronuclear Single Quantum Correlation)スペクトルでシグナルの縮重を軽減し、3次元HNCOスペクトルでアミドプロトン、アミド窒素、カルボニル炭素化学シフト間の相関が得られる。さらにHN(CA)COスペクトルで同一残基内の化学シフト相関が得られ、主鎖に沿った連鎖的な帰属については3次元CBCA(CO)NH及びCBCANHスペクトルによって効果的に行われる。また、一般には、アミノ酸残基の同定は側鎖のスピンシステムを利用する。 ^1H - ^{15}N TOCSY-HSQC(^{15}N -edited TOCSY)やH(CCO)NHから得られた側鎖プロトンの化学シフトや、C(CO)NHやHCCH-TOCSYによって得られる側鎖炭素原子の化学シフト値から側鎖スピンシステムを解析し、特徴的なパターンを観測させる。このようにアミノ酸タイプとそのつながりを既知のアミノ酸配列を照合させていくことによって帰属が完成する。

【0024】NMRによるタンパク質の立体構造決定に使われる構造情報は、核間距離情報、2面角情報、水素結合情報である。そのうち最も大きな役割を果たしているのは水素原子間の核間距離情報である。水素原子間距離はNOESYスペクトルと呼ばれる水素原子間距離に依存したNOE交差ピークを与える2次元スペクトルで求められる。これらの情報を使用して、分子動力学計算を利用したシミュレーテッド・アニーリング法により立体構造を計算する。これによって得られた数十個の収束構造を重ね合わせ、平均構造を得、その平均構造から各構造の座標の二乗平均誤差(R. m. s. d.)を求め、主鎖のR. m. s. d.が0.8 Å以下であるか評価を行う。さらに得られた構造について、ファンデルワールスエネルギー項のチェック、Ramachandran図による評価を行い構造の妥当性について検討する。

【0025】こうして本発明の高度好熱菌RRFに基づいて得ることができる3次元構造は、CARDによる創薬システムのための重要な情報である。RRFが抗生物質開発のターゲットとして注目されていることは既に述べたとおりである。このRRFの活性中心を明らかにし、その部位に結合して活性を阻害する物質を検索することは、RRFを標的分子とする抗生物質開発の重要なステップであ

る。抗菌活性に優れ、しかも高度な安全性を持った抗生物質の候補化合物の構造を予測するには、RRFの活性部位に関する詳細な情報が不可欠である。RRFと終止コンプレックスとの反応には、リボソーム、tRNA、mRNA、あるいはEF-Gといった多様な成分が関与している。したがって、RRFの活性部位にはこれら複数の成分との相互作用部位の存在も予想される。X線結晶構造解析に基づく3次元構造に関する情報の他、NMRによる原子間の距離に関する情報等も含めて、構造既知の他のタンパク質合成の可溶性因子との比較に基づいて活性部位の推定が可能である。たとえばタンパク鎖の伸長因子であるEF-G(E. coli J. 13, 16, 3669-3677, 1994)やEF-Tu(Kjeldgaard M. et al., J. Mol. Biol. 223, 721-742, 1992)は既にその構造が決定されている。これらの可溶性因子と構造を比較すれば、本発明の高度好熱菌RRFにおけるリボソーム結合部位の推定が可能である。事実タンパク質終止因子であるRF-1やRF-3等はタンパク質伸長因子であるEF-GやEF-Tu等とともにtRNAと同様の3次元構造を取ることが明らかにされている(Nakamura, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 5443, 1996)。RRFはこれらの因子と同じようにリボソームA部位に結合すると考えられることから(Janosik et al. Dual functions of ribosome recycling factor in protein biosynthesis: disassembling the termination complex and preventing translational errors. Biochimie 78:959-969, 1996)、RRFの活性部位(特にリボソームと反応する部位)は、RRFの3次元構造を他の可溶性因子のそれと比較することで明らかにできる。こうして推測された活性部位は、公知の生化学的手法、あるいは分子遺伝学的手法により確認される。

【0026】活性部位の決定はジメチルスペリミデートのような化学リンカーを用いて行う方法が一般的である。その原理は、RRFが例えばリボソームのタンパク質と反応するサイトは、反応中に至近距離に近づくことから、両者を化学リンカーによって結合させれば活性部位のアミノ酸がこの試薬によって結合されることに基づいている。また、RRFはもう一つの可溶性因子であるEF-Gとも反応するので、この部位も同じ手法によって決定することが可能である。同様に、リボソームRNAと反応する活性部位はケトキサルのようなリンカーを利用して決定することができる。

【0027】活性部位の確認方法として、3次元構造から推定される活性部位を構成するアミノ酸配列に相当するペプチドを化学的に合成し、そのRRF活性阻害を観察する方法を採用することもできる。この方法は、CD4とMHC Class IIタンパク質の相互反応の活性部位の決定に有効であった。公知の組み合わせにおいては、更にこの方法により活性部位を確認後、CARDにより極めて有効な阻害剤に到達している(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 73, 1997)。したがって、RRFの阻害剤開発においても、有効な手法となることが期待できる。

【0028】RRFは4つの異なった基質と相互作用する。つまり、mRNA、リボソーム、tRNA、そしてEF-Gである。これらの基質のうちリボソームは、RNAとタンパク質とで構成される巨大分子であり、これに対する活性部位は最低2箇所が予想される。したがってRRFには少なくとも5箇所の活性部位が考えられる。すなわち、リボソームサイト1、リボソームサイト2、tRNAサイト、mRNAサイト、そしてEF-Gサイトである。

【0029】活性部位を決定した後は、コンピュータによる候補化合物の推定が行われる。活性部位に結合する化合物のコンピュータによる推定には、次のような方法が知られている。

【0030】分子の3次元構造に基づく薬物設計については、医薬品の開発・第7巻「分子設計」（廣川書店）をはじめとして数多くの総説がある。具体的には、第一にFlexiDock、FlexX等のフレキシブルリガンドバインディングシミュレーションソフトウェアを用いて、Oracle等のリレーションデータベースに格納された低分子（分子量1000以下）化合物のライブラリー（たとえば約150000種）をコンピュータでスクリーニングする。このライブラリー内の化学物質はCONCORD等のプログラムで3次元構造を指定し、活性部位にはめ込める物質を選択することができる。選ばれた物質の中からInsight IIやMOE等のシミュレーションプログラムを用いて肉眼により更によく活性部位にあてはまる化合物を絞り込む。一連の過程で利用されるコンピュータソフトウェアは、いずれも以下のような市販のものである。

FlexiDock: Tripos Inc.

FlexX: Tripos Inc.

CONCORD: Tripos Inc.

Oracle: Oracle Corp.

Insight II: Molecular Simulations Inc.

MOE: Chemical Computing Group Inc.

候補化合物はRRFのアッセイ法によって阻害活性を測定する。RRFには上述のように活性部位が複数存在すると考えられるので、以上の操作をそれぞれの活性部位について行い、いくつかの候補化合物を選択する。有効候補物質を実際にRRFと混合しNMR解析、および結晶化してそのフィットを検討する。更にフィットを有機合成を用いて修飾することにより、より望ましい構造とする。この方法によって2年足らずという短期間の間に実用化を達成したものもある(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 73, 1997)。RRFは複数の活性部位を持つために事実上は800000程度の候補物質から選択できることになる点で、この方法を適用するのに好適なターゲット分子である。

【0031】第二の方法は、未知の物質を含めた候補化合物のコンピュータによる設計である。この方法には、メチル、エチル等の化学基を活性部位に並べてフィットするものを探す方法と、原子を活性部位にコンピュータプログラムを用いて並べていく方法とが知られて

いる。これらの方法は、ライブラリーに候補化合物を限定されない点で、理論的には第一の方法よりもはるかに勝っている。

【0032】このような操作を何度も繰り返すことで、候補化合物の絞り込みが行われる。絞り込まれた化合物は合成され、実際に抗菌活性に基づいてスクリーニングされる。十分な抗菌活性を示した候補化合物は、更に動物実験によってin vivoでの抗菌活性や、体内動態、あるいは毒性等に関して試験される。

10 【0033】本発明による高度好熱菌RRFは、RRF阻害化合物の生化学的な手法によるスクリーニングにおいても有用である。すなわち、本発明のRRF、あるいはその活性部位を含む断片と、候補化合物とを接触させ、RRFあるいはその断片に対して結合活性を示す化合物を選択することにより、RRFの活性を阻害する化合物のスクリーニングが行われる。本発明による高度好熱菌RRFは安定性に優れるため、少量のタンパク質で繰り返しスクリーニングを行うことができる。また、耐熱性であることを生かして高温でのスクリーニングを可能とする。一般に抗生物質の活性は高温ではより強く現れる。したがって、高温条件下でのスクリーニングには、候補化合物の活性を高い感度で検知できるメリットがある。しかし、そのターゲットとなる因子が高温での活性を維持できるものでなければ高温でのスクリーニングは行えない。本発明のRRFは、高度好熱菌に由来するため高度な耐熱性を有するものと考えられ、公知のRRFでは実現できなかった高温条件下でのスクリーニングを可能とする。

30 【0034】加えて本発明は、本発明に基づくDNAに特異的にハイブリダイズするDNAであって、少なくとも14ヌクレオチドの鎖長を有するDNAに関する。本発明において特異的とは、ストリンジェントな条件下で他のタンパク質をコードするDNAとクロスハイブリダイゼーションしないことを意味する。このような条件を満たすDNAは、高度好熱菌RRFをコードするDNAを検出、あるいは単離するためのプローブやプライマーとして有用である。特に本発明に基づくオリゴヌクレオチドが、図4に示すようなThermus thermophilusを含む幅広い種の間で高度に保存されている領域に相当する部分に対応する塩基配列を含む場合には、Thermus thermophilus以外の高度好熱菌でRRFのクローニングを進めるためのプローブ、あるいはプライマーとして利用することができる。未知のRRF遺伝子増幅に有用なプライマーを構成する塩基配列としては、図1に示したコンセンサス領域に対応する塩基配列を挙げるることができる。すなわち、配列番号：3、配列番号：4、および配列番号：5である。この塩基配列を含むオリゴヌクレオチドは、未知のRRF遺伝子増幅を目的とするプライマーとして有用である。これらの塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとするには、配列番号：3、配列番号：4、および配列番号：5から選択された任意の2つの塩基配列（あるい

はそれを含む塩基配列)をプライマーセットとして利用することができる。

【0035】更に本発明は、高度好熱菌RRFを認識する抗体に関する。本発明による抗体は、高度好熱菌RRFを利用して当業者に公知の方法によって得ることができる。本発明による抗体は、ポリクローナル抗体であることもできるし、モノクローナル抗体として得ることもできる。ポリクローナル抗体は、適当な免疫動物に本発明の高度好熱菌RRF、あるいはそのドメインペプチドを免疫し、回収された血清からイムノグロブリンを精製することによって得ることができる。免疫動物には、一般に、ウサギ、モルモット、あるいはマウス等が用いられる。免疫にあたっては、フロイントのコンプリートアジュバント(FCA)等のアジュバントが利用される。モノクローナル抗体は、免疫動物の抗体産生細胞を回収し、これをミエローマ細胞等の適当な融合パートナーと細胞融合させ、必要な活性を持った抗体を産生するクローンをスクリーニングすることによって得ることができる。抗体産生クローンを培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を精製する。抗体の精製は、プロテインA固定樹脂へのIgGの吸着と回収によって行われる。あるいは、免疫に用いたRRFを固定化したカラムによるイムノアフィニティクロマトグラフィーに基づいて精製することもできる。こうして得ることができる本発明による抗体は、高度好熱菌RRFの精製や検出等に利用することができる。本発明による抗体を高度好熱菌RRFの検出に利用する場合には、放射性同元素や酵素、あるいはビオチンのような親和性リガンドによって標識しておくことができる。続いて実施例に基づいて、本発明を更に具体的に説明する。

【0036】

【実施例】1) PCR (polymerase chain reaction) 法による高度好熱菌RRF (tRRFと省略) 遺伝子の増幅

(a) 既知のRRF遺伝子の配列比較から保存された配列領域(Ito, K., Nakamura, Y.: Cloning and overexpression of polypeptide release factor 1 of *Thermophilus*. *Biochimie*, 79:287-292, 1997)を見出し

(図1)、PCR増幅(Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with athermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491)のためのプライマーとして、次のような1種類の順(センス)方向プライマー(Pup; 配列番号: 3)と2種類の逆(アンチセンス)方向プライマー(Pdown1; 配列番号: 4, Pdown2; 配列番号: 5)を設計した。

Pup 5'-GTSGASTACTACGG-3'

Pdown1 5'-CKNCKYTCYTCNGTNARNGSNGG-3'

Pdown2 5'-CGSCGSAYGTTMCGSAC-3'

(ただし、S=C/G、Y=C/T、K=G/T、N=A/G/T/C、M=A/C、R

=A/G)

(b) Pup - Pdown2を用いてのPCR反応で、高度好熱菌ゲノムDNAより233-bpのfragment 1を得た(図2のA)。さらに、増幅されたfragment 1を鋳型にPup - Pdown1を用いてのPCR反応で、206-bpのfragment 2を得た(図2のB)。

(c) 得られたfragment 2をプローブとして、高度好熱菌ゲノムDNAを限定分解しSouthern blot hybridizationを行った。その結果、fragment 2は高度好熱菌ゲノムDNA由来であることが確認された。

【0037】2) 高度好熱菌RRF遺伝子のクローニング

(a) 高度好熱菌ゲノムDNAをSau3Aで限定分解し、IEML3 vectorのBamH I サイトにサブクローニングした。これを高度好熱菌ゲノムライブラリー(IEML3-tRRFプール)とした。

(b) fragment 2をプローブとしてplaque hybridizationを行い、高度好熱菌RRF遺伝子をスクリーニングし、陽性クローンを分離した。

(c) 得られた陽性クローンからファージDNAを調製した。これを数種の制限酵素で分解し電気泳動後、fragment 2をプローブとしてSouthern blot hybridizationを行った。

(d) ファージDNAをBamH Iで分解することで得られた約3-kbの陽性フラグメントをプラスミドpUC119 [Vieira J, Messing J (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods. Enzymol* 153, 3-11] にサブクローニングした。

【0038】3) 高度好熱菌RRF遺伝子の塩基配列解析

(a) 得られたpUC-tRRFクローンをを用いてジデオキシ法(Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467)により高度好熱菌RRF遺伝子の全塩基配列を決定した(図3)。高度好熱菌RRFタンパク質は、185個のアミノ酸から構成される、分子量20994 Daのタンパク質であることが明らかになった。

(b) そのアミノ酸配列を他のRRFタンパク質の配列と比較すると、比較的高い保存性が認められる(図4)。大腸菌RRFタンパク質とは、44%の同一アミノ酸、67%の相同アミノ酸を保持する。それらの生物種を越えて保存された領域は、RRFの活性に重要なドメインを形成するものと考えられる。

【0039】4) 高度好熱菌RRFの過剰生産プラスミドの作成

(a) 高度好熱菌RRFの過剰生産・精製系を確立するため以下の3種類のオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。

sense primer; 配列番号: 6

5'-NNNTCTAGAAATAATTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATAGACCTGAAGGAGCTTTACGCG-3'

antisense primer1; 配列番号: 7

5'-NNNGGATCCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGCTGCCAGGATCTCCT
GCTCCTT-3'

antisense primer2; 配列番号: 8

5'-NNNGGATCCTCAGCCAGGATCTCCTGCTCCTT-3'

(b) pUC-tlRRFを鋳型にsense primer - antisense primer1、sense primer - antisense primer2を用いてPCR反応を行い、得られたフラグメントをプラスミドpET30aのXba I、BamH I部位にサブクローニングした。sense primer - antisense primer1の組み合わせで得られたフラグメントにはC末端にヒスチジンタグが付加される。これをサブクローニングしたものをpET30-tlRRFH6、sense primer - antisense primer2の組み合わせで得られたフラグメントをサブクローニングしたものをそれぞれpET30-tlRRFH6 (図5)、pET30-tlRRF (図6)と命名した。

【0040】5) 高度好熱菌RRFの過剰生産と精製

(a) pET30-tlRRFH6ならびにpET30-tlRRFプラスミドを大腸菌株BL21 (DE3) (Novagen社製) に形質転換した。BL21 (DE3) 株はT7 RNAポリメラーゼをIPTGにより発現誘導でき、pET30プラスミド系に組み込まれたT7プロモーターを稼働させる宿主菌として高発現ができる。

(b) 個々の形質転換体をLB/カナマイシン培地中で培養し、log phaseで終濃度0.5mM IPTG、0.5% グルコースとしてタンパク質の発現誘導をかけた。

(c) SDS-PAGEによって目的タンパク質の発現誘導を確認した (図7、レーン3)。

(d) C末端にhistidine tagが付加された高度好熱菌RRFをProBond Resin (Invitrogen社) で精製した (図7、レーン2)。

(e) 上記粗精製で得られたタンパク質をRESORSE Sカラム (Pharmacia Biotech社) を用い、高圧クロマトシステム (AKTA explorer 100, Pharmacia Biotech社) を使って精製分離した。精製タンパク質のSDS-PAGEのコマジ染色像 (図7、レーン1)、ならびに高圧クロマトグラフィの溶出パターン (図8) を示す。

【0041】6) 高度好熱菌RRF遺伝子の相補機能試験

(a) pET30aにサブクローニングしたフラグメントと同一のものをpSUIQ [Uno M, Ito K, Nakamura Y (1996) Functional specificity of amino acid at position 246 in the tRNA mimicry domain of bacterial release factor 2. *Biochimie* 78, 935-943] にサブクローニングし、これをpSUIQ-tlRRFH6、pSUIQ-tlRRFとした。pSUIQプラスミドはlacプロモーターの発現ベクターであり、IPTG依存的にクローンしたRRF遺伝子の発現を制御できる。

【0042】(b) 大腸菌のRRF遺伝子の欠損変異株を用いた相補試験

RRFを欠損した大腸菌TF1001を作製し、これに前記RRF発現ベクターを形質転換することにより本発明のRRF遺伝子の機能を確認した。RRF欠損大腸菌TF1001は、P1ファ

ージを利用したヒドロキシルアミンによる局所的な突然変異誘発に基づいて作製した。まずMG12025 (zad-220::Tn10、テトラサイクリン耐性TcRマーカーがRRF遺伝子と約50%のco-transduction頻度を示す) 株からP1ファージを調製した。得られたP1ファージを0.1M リン酸カリウム緩衝液(pH6.0)/1M ヒドロキシルアミンで37℃で12時間処理した。ヒドロキシルアミン処理したP1ファージを大腸菌KH5402 (tyr (Am) trpE9829 (Am) thr metE ilv thy supF6 (Ts); Inada T. et al, Conditionally lethal amber mutations in the leader peptidase gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, :585-587, 1989) 株に感染させた。テトラサイクリン耐性の形質導入コロニー (transductant) をテトラサイクリンを含むLBプレート上で37℃で選択した。得られたプレートを新規のテトラサイクリン含有LBプレートにレプリカし、42℃で保温して高温致死性のコロニーをts mutantsとして同定し単離した。これらのts mutantsを大腸菌の野生型のRRF遺伝子のみを持つプラスミド (pTWV-eRRFH6) で形質転換した。アンピシリン耐性のコロニーを選択し、42℃で生育の回復する変異体TF1001を得た。使用したpTWV-eRRFH6プラスミドはRRFの構造遺伝子配列 (開始コドンから終結コドンの塩基配列) のみしか持たないので、この相補テストの結果は得られたTF1001株の温度感受性変異がRRF遺伝子の変異であることを証明するものである。続いて相補試験は、以下のように行った。RRF欠損大腸菌TF1001を、pSUIQ-tlRRFH6ならびにpSUIQ-tlRRFで形質転換し、0、0.01、0.1、および1mMのIPTGを含むLBプレート上にまいて42℃で培養し生育を観察した。図9に示したように、IPTG濃度が0.1mM以上の場合に大腸菌の生育が観察された。この結果が高度好熱菌RRFの発現によるものであることを証明するために、生育コロニーにおける高度好熱菌RRFの発現状態をウェスタンブロット法によって確認した。実験に用いたプラスミドが発現すればヒスチジンタグを結合したRRFを生成することから、検出はNi-NTA affinity stainingによって行った。このウェスタンブロット法の結果 (図10) から明らかのように、IPTGの濃度依存的にRRF融合タンパク質 (ヒスチジンタグ) の発現量が増加している。以上の結果から、RRF欠損大腸菌TF1001の生育の回復は、本発明による高度好熱菌RRFの発現によって相補された結果もたらされたものであることが立証された。

【0043】

【発明の効果】本発明によって、より容易に結晶化させることができる高度好熱菌RRFを得ることができる。結晶化RRFは、CARDによるRRFをターゲットとした抗菌剤開発に必要な3次元構造解析を行うための試料として有用である。

【0044】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

19

20

<110> RRF Research Inc.

<120> Highly Thermophilic Bacterial RRF Gene

<130> RRF

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 558

<212> DNA

<213> Thermus thermophilus

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (555)

<400> 1

```

atg acc ctg aag gag ctt tac gcg gaa acc cga agc cac atg caa aag 48
Met Thr Leu Lys Glu Leu Tyr Ala Glu Thr Arg Ser His Met Gln Lys
      1              5              10              15
agc ctc gag glc ctg gag cac aac ctg gcg ggc ctc cgc acc ggc cgc 96
Ser Leu Glu Val Leu Glu His Asn Leu Ala Gly Leu Arg Thr Gly Arg
              20              25              30
gcc aac ccc gcc ctc ctc ctg cac ctg aag gtg gag tac tac ggc gcc 144
Ala Asn Pro Ala Leu Leu Leu His Leu Lys Val Glu Tyr Tyr Gly Ala
              35              40              45
cac gtc ccc ctg aac cag atc gcc acc gla acc gcc ccc gac ccc agg 192
His Val Pro Leu Asn Gln Ile Ala Thr Val Thr Ala Pro Asp Pro Arg
              50              55              60
acc ctg gtg gtc cag tcc tgg gac cag aac gcc ctc aag gcc ata gag 240
Thr Leu Val Val Gln Ser Trp Asp Gln Asn Ala Leu Lys Ala Ile Glu
              65              70              75              80
aag gcc atc cgg gac tgg gac ctg ggc ctg aac ccc agc aac aag ggg 288
Lys Ala Ile Arg Asp Ser Asp Leu Gly Leu Asn Pro Ser Asn Lys Gly
              85              90              95
gac gcc ctc tac atc aac atc ccg ccc ctc acg gag gaa agg cga aag 336
Asp Ala Leu Tyr Ile Asn Ile Pro Pro Leu Thr Glu Glu Arg Arg Lys
              100              105              110
gac ctg gtg cgg gcg glg cgg cag tac gcc gag gag ggg cgg gtg gcc 384
Asp Leu Val Arg Ala Val Arg Gln Tyr Ala Glu Glu Gly Arg Val Ala 1
              115              120              125
atc cgc aac atc cgc cgc gag gcc ttg gac aag ctg aag aag ctg gcc 432
Ile Arg Asn Ile Arg Arg Glu Ala Leu Asp Lys Leu Lys Lys Leu Ala
              130              135              140
aag gag ctc cac ctc tcc gag gac gag acc aag cgg gcg gag gcg gag 480
Lys Glu Leu His Leu Ser Glu Asp Glu Thr Lys Arg Ala Glu Ala Glu145
              150              155              160
atc cag aag atc acc gac gag ttc atc gcc aag gcc gac cag ctg gcg 528
Ile Gln Lys Ile Thr Asp Glu Phe Ile Ala Lys Ala Asp Gln Leu Ala
              165              170              175
gag aag aag gag cag gag atc ctg ggc tga 558
Glu Lys Lys Glu Gln Glu Ile Leu Gly

```

21

22

180

185

<210> 2

<211> 185

<212> PRT

<213> Thermus thermophilus

<400> 2

```

Met Thr Leu Lys Glu Leu Tyr Ala Glu Thr Arg Ser His Met Gln Lys
  1             5             10             15
Ser Leu Glu Val Leu Glu His Asn Leu Ala Gly Leu Arg Thr Gly Arg
      20             25             30
Ala Asn Pro Ala Leu Leu Leu His Leu Lys Val Glu Tyr Tyr Gly Ala
      35             40             45
His Val Pro Leu Asn Gln Ile Ala Thr Val Thr Ala Pro Asp Pro Arg
      50             55             60
Thr Leu Val Val Gln Ser Trp Asp Gln Asn Ala Leu Lys Ala Ile Glu
      65             70             75             80
Lys Ala Ile Arg Asp Ser Asp Leu Gly Leu Asn Pro Ser Asn Lys Gly
      85             90             95
Asp Ala Leu Tyr Ile Asn Ile Pro Pro Leu Thr Glu Glu Arg Arg Lys
      100            105            110
Asp Leu Val Arg Ala Val Arg Gln Tyr Ala Glu Glu Gly Arg Val Ala
      115            120            125
Ile Arg Asn Ile Arg Arg Glu Ala Leu Asp Lys Leu Lys Lys Leu Ala
      130            135            140
Lys Glu Leu His Leu Ser Glu Asp Glu Thr Lys Arg Ala Glu Ala Glu
      145            150            155            160
Ile Gln Lys Ile Thr Asp Glu Phe Ile Ala Lys Ala Asp Gln Leu Ala
      165            170            175
Glu Lys Lys Glu Gln Glu Ile Leu Gly
      180            185

```

<210> 3

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

gtsgastact acgg

14

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

cknckylcyl cnglnarngs ngg

23

<210> 5

23

24

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

cgscgsaygt lmcgsac

17

<210> 6

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

nnntctagaa ataatttltgt ttaacttttaa gaaggagata tacatatgac cctgaaggag 60
ctttacgcg 69

<210> 7

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

nnnggatcct cagtggttgtt ggtggtgglt gctgcccagg atctcctgct cctt 54

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

nnnggatcct cagcccagga tctcctgctc ctt

33

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence for T.th. RRF

<400> 9

atgaccctga aggagcttta cgcg

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
rimer Sequence for T. th. RRF

Synthesized P

<400> 10

lcagcccagg atctccigct cctt

24

【図面の簡単な説明】

【図 1】既知のRRF遺伝子との配列比較。囲みはプライマーの設計のために見出した保存配列を示す。囲み1に対してPup、囲み2に対してPdown1、囲み3に対してPdown2を各々設定した。

【図 2】高度好熱菌ゲノムDNAからPCR反応によって増幅されたRRF遺伝子fragment。各々増幅されたfragmentを矢印で示してある。AはPup-Pdown2を用いてのPCR反応で高度好熱菌ゲノムDNAから増幅されたfragment1の5%ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動図。BはPup-Pdown1を用いてのPCR反応でfragment1から増幅されたfragment2の5%ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動図。

【図 3】高度好熱菌RRF遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列。

【図 4】高度好熱菌RRFアミノ酸配列と既知のRRF遺伝子の配列比較。囲みは保存配列を示す。

【図 5】pET30-tlRRFH6の構造を示す模式図。下線部がサブクローニングした遺伝子で、その中で斜体部分はtlRRFH6の翻訳領域を示す。

【図 6】pET30-tlRRFの構造を示す模式図。下線部がサ

ブクローニングした遺伝子で、その中で斜体部分はtlRRFの翻訳領域を示す。

【図 7】高度好熱菌RRFタンパク質のSDS-PAGEのコマジ染色像。

10 【図 8】C末端にヒスチジンタグが付加された高度好熱菌RRFをProBond Resinで精製後得られたタンパク質を、高圧クロマトシステムを使って精製分離した時の溶出パターン。

【図 9】相補試験におけるpSUIQ-tlRRFで形質転換されたRRF欠損大腸菌TF1001の培養結果を示す写真。図中に示すとおり、左下から順にIPTG添加濃度が0、0.01、0.1、および1mMに対応している。

【図 10】pSUIQ-tlRRFで形質転換されたRRF欠損大腸菌TF1001におけるRRF融合タンパク質のウェスタンブロット法による分析結果を示す写真。各レーンは、以下の培養物に対応する。

レーン 1 : IPTG添加濃度 0mM

レーン 2 : IPTG添加濃度 0.01mM

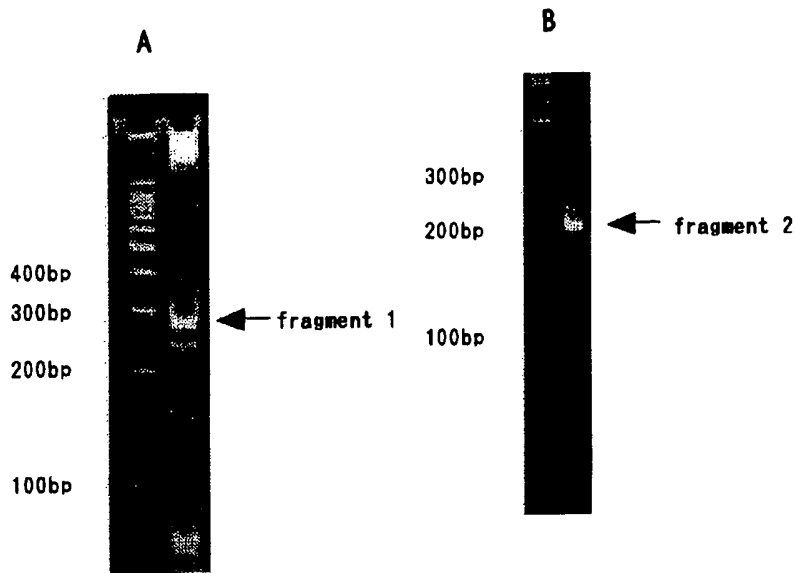
レーン 3 : IPTG添加濃度 0.1mM

レーン 4 : IPTG添加濃度 1mM

【図 1】

Aquifex aeolicus	1:MIKELEIDFKEAEKDMKAVEYYKNEIAGLRSTRASTALVEEIKVEYGGSKVPIKQLGTI 60
Bacillus subtilis	1:MSKEVLTTQTEKMEKAIAYQRELATVRAGRANPSLLDKVTVEYGAQTPLNQLSSI 57
Escherichia coli	1:MSIDIRKDAEVRMDKVEAFKQISKIRTAGRASPSSLDGIWVEYGGTPTPLRQLASV 57
Haemophilus influenzae	1:MLNQIKKDAQDRMEKSLKALKGHISKIRTAGRASPSSLDGIWVEYGAQTPLRQLANV 57
Mycobacterium leprae	1:MI-D-EALF-DAAEKMEKAVSVAREDLSMIRTAGRANPSLLDKVTVEYGGTPTPLRQLASI 57
Staphylococcus aureus	1:MS-DIINETKSRMKSIESLSRELANISAGRANPSLLNGVTVDYGGAPTVPQQLASI 56
Aquifex aeolicus	61:SVPEHNQIVIQVWDQNAVPAIEKAIRE-ELNLTPTVQGNVIRVTLPPTEERRRELVRLL 119
Bacillus subtilis	58:NVPEARMLVITPYDKTAIGDIEKAILKADLGLTPTSDGNMIRIAIPALTEERRKELVKV 117
Escherichia coli	58:TVEDSRTLKINVFDRSMSPAVEKAIMASDLGLNPSAGSDIRVPLPPLTEERRKDLTKIV 117
Haemophilus influenzae	58:VAEDARTLAVTVFDRSLISAVEKAILTSDGLNPSAGSTIRVPLPPLTEERRRDLIKIV 117
Mycobacterium leprae	58:NVPEARLVVVKPYDAIQLHAJETAIRNSDLGVNPSNDGTLIRVAVPOLTEERRRELVKQA 117
Staphylococcus aureus	57:NVPEARLLVISPYDKTSVADIEKAIANLGVNPTSDGEVIRIAPALTEERRKERVKDV 116
Aquifex aeolicus	120:HKITEEARVRVVRNVRREAKEMIEEL-EG-ISEDEKKRALERLQKLTDKYIDEINKLMEA 176
Bacillus subtilis	118:KKYAEAEKAVVRNVRDANDDLKLEKNGDITEDELRATEDVQKLTDEYVSKIDSVTKD 177
Escherichia coli	118:RGEAEQARVAVRNVRDANDKVKALLKKEISEDDRRSQDDVQKLTDAAIKKIEAALAD 177
Haemophilus influenzae	118:KGEGEGQKAVRNVRDANDKIKALLKKEISENQKAEIEIQKIDTIYIKKIDEVLAD 177
Mycobacterium leprae	118:KCKGEDAKVSRNIRKVMELHRIRKDGAGEDEVSRAEKDLKTTTQYVIQIDELVKH 177
Staphylococcus aureus	117:KKIGEEAKVSRNIRDMNDQLKKDEKNGDITEDELRSGTEVQKATDINSIKIDQMIAD 176
Aquifex aeolicus	177:KEKEIMSV----- 184
Bacillus subtilis	178:KEKEIMEVKTMYNRKDPLMFTG----- 199
Escherichia coli	178:KEAELMQF----- 185
Haemophilus influenzae	178:KEKELMDF----- 185
Mycobacterium leprae	178:KEGELLELV----- 185
Staphylococcus aureus	177:KEKDIMS----- 184

【図 2】



【図 3】

```

10      20      30      40      50      60
ATGACCCTGAAGGACCTTTACGGCGAAACCCGAAGCCACATGCAAAAGCCTCGAGGTC
M T L K E L Y A E T R S H M Q K S L E V

70      80      90      100     110     120
CTGGAGCACAACTGGCGGGCTCCGCACCGCGCGGCCAACCCGCCCTCCTCCTGCAC
L E H N L A G L R T G R A N P A L L L H

130     140     150     160     170     180
CTGAAGTGGAGTACTACGGCGCCACGTCCTCCCTGAACCCAGATCGCCACCGTAACCGCC
L K V E Y Y G A H V P L N Q I A T V T A

190     200     210     220     230     240
CCCGACCCAGGACCTCGTGGTCCAGTCTGGGACCGAGAACGCCCTCAAGGCCATAGAG
P D P R T L V V Q S W D Q N A L K A I E

250     260     270     280     290     300
AAGGCCATCCGGGACTCGGACCTGGGCTGAACCCAGCAACAAGGGGACGCCCTCTAC
K A I R D S D L G L N P S N K G D A L Y

310     320     330     340     350     360
ATCAACATCCCGCCCTCAGGAGGAAAGGCGAAAGGACCTGGTGGCGGGCGGTGCGGCAG
I N I P P L T E E R R K D L V R A V R Q

370     380     390     400     410     420
TACCGGAGGAGGGGCGGCTGCCATCCGCAACATCCCGCGGAGGCCTTGGACAAGCTG
Y A E E G R V A I R N I R R E A L D K L

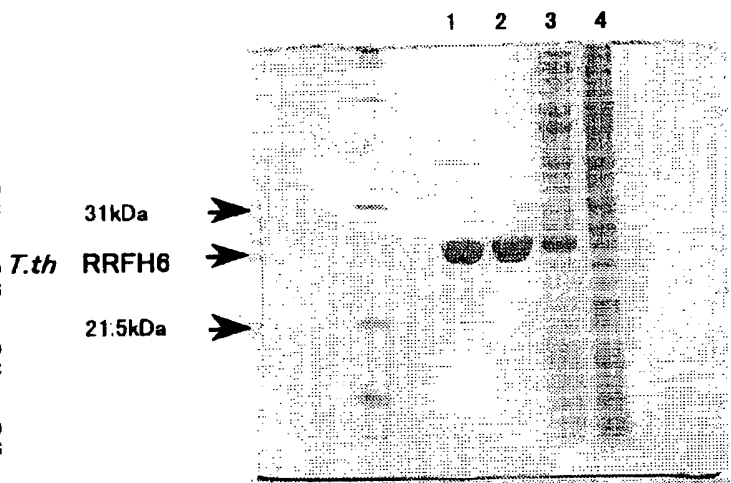
430     440     450     460     470     480
AAGAAGCTGGCCAAGGAGCTCCACCTCTCCGAGGACGAGACCAAGCGGGCGAGGGCGGAG
K K L A K E L H L S E D E T K R A E A E

490     500     510     520     530     540
ATCCAGAAGATCACCGACGAGTTTCATCGCCAAGGCCGACCAAGCTGGCGGAGAAGAAGGAG
I Q K I T D E F I A K A D Q L A E K K E

550     560
CAGGAGATCCTGGGCTGA
Q E I L G *

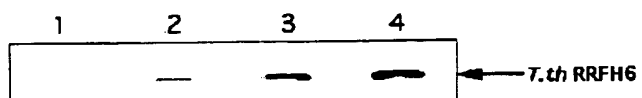
```

【図 7】



1. *T.th* RRFH6 RESOURCE S
2. *T.th* RRFH6 ProBond Resin
3. *T.th* RRFH6 未精製
4. BL21(DE3)

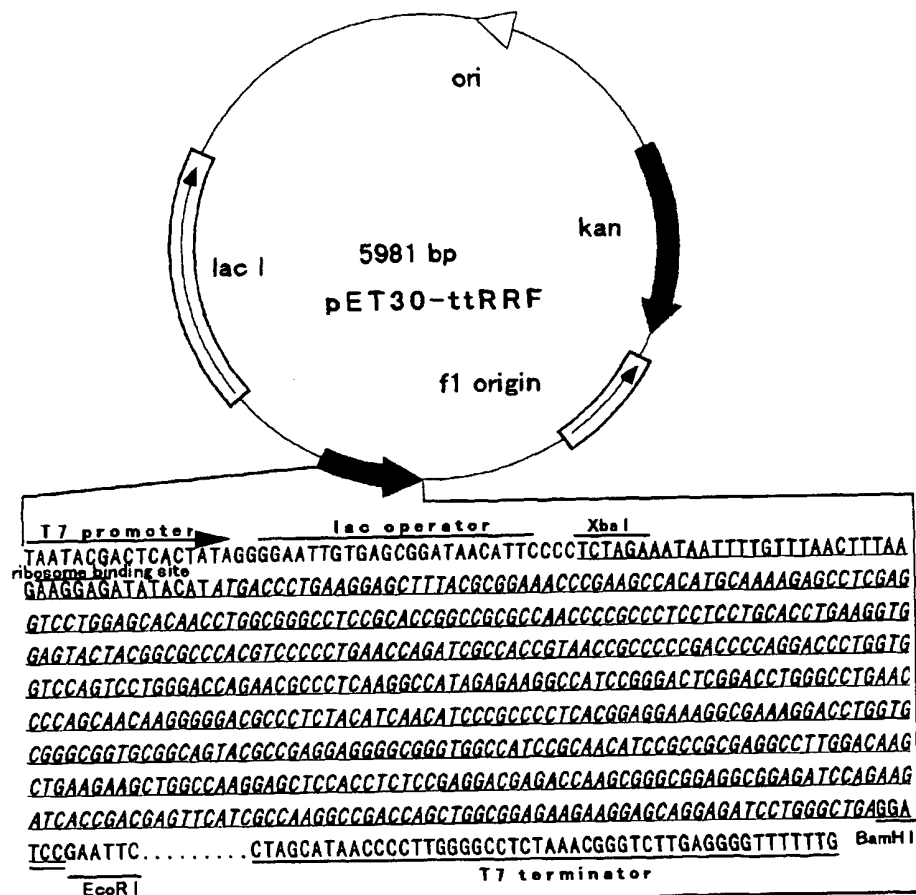
【図 10】



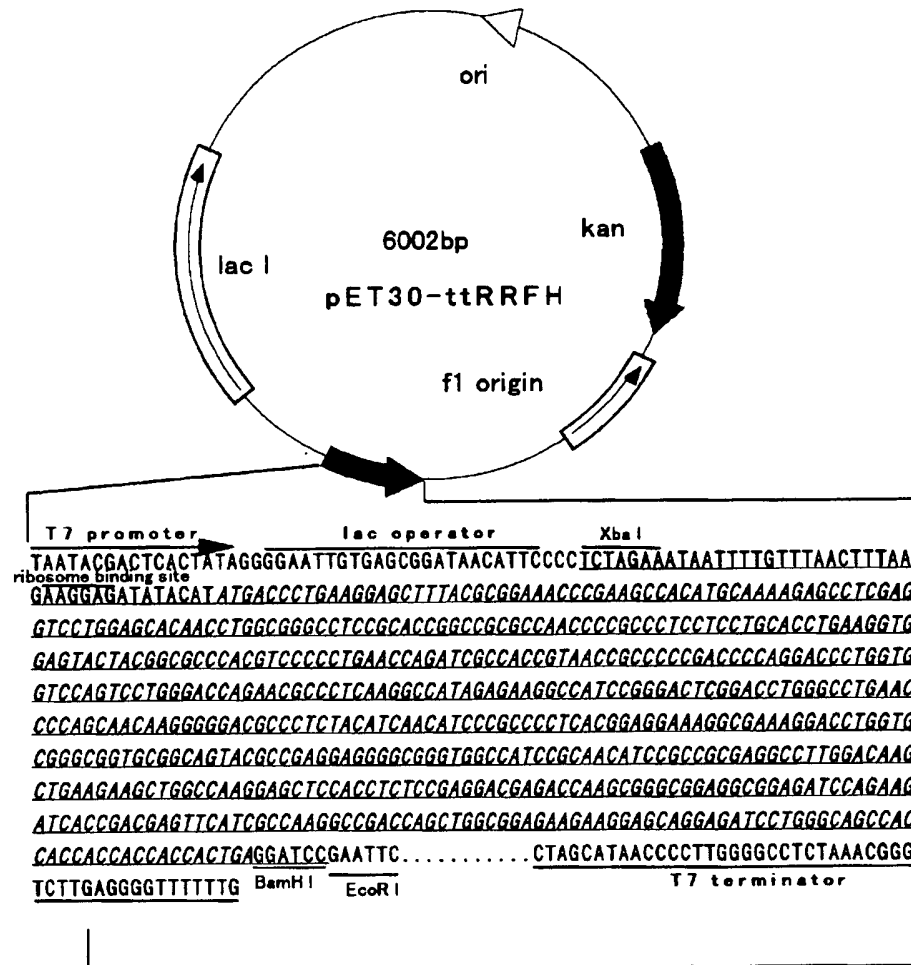
【図 4】

Aquifex aeolicus	1:MIKEEDIFKEAEKDKKAVEYKNEIAGLRSTASTALVEEIKVEYVGSVPKDLGTI 60
Bacillus subtilis	1:--NSKEVLTOTKEKHEKAAAYQRELATVRAGANPSLLDKVTVEYGAQTPLDLSSI 57
Escherichia coli	1:--NISDIRKDAEVRHDKVEAFKTOISKIRGRAPSLLDGIVVEYGTPTPLRLASV 57
Haemophilus influenzae	1:--HLNQIKKDAQDRHEKSLKALGHISKIRGRAPSLLDGIVVEYGAATPLRLANV 57
Mycobacterium leprae	1:--HIDEALFDAEEKHEKAVSVAREDLSHIRGRANPGMFSRLVIDYGSATPTTDLASI 57
Staphylococcus aureus	1:--HS-DIINETKSRHDKSIESLSRELANISAGRANSLNGVTVDYGAFTVQDLASI 56
Thermus thermophilus	1:--MTLKELYAETRSHDKSLVLEHNLGRLTGRANPALLHLKVEYGAHVELNDIATV 58
Aquifex aeolicus	61:SVPEHNOIVIQVQDQNAVPAIEKATRE-EINLNPVQGVNIRVTUPPLEERRRELVRLL 119
Bacillus subtilis	58:NVPEARMLVITPYDKTAIGDIEKATLKADLGLTPSDENMIRIATPALTEERRKELVKVV 117
Escherichia coli	58:TVEDSRTLKINVFDRSMSPAVEKATMASDLGLNPSSAEDIRVPLPLTEERRDLTKIV 117
Haemophilus influenzae	58:VAEDARTLAVTVFDRSLISAVEKATLTSGLNPSSAETIRVPLPLTEERRDLTKIV 117
Mycobacterium leprae	58:NVPEARLVVIKPYDAIQLHAIEKATIRNSDLGNPSSNDITIRVAPPLTEERRRELVRQA 117
Staphylococcus aureus	57:NVPEARLLVISPDKTSVADIEKATIAAMLVNPTSDDEVIRIAPALTEERRKERVQDV 116
Thermus thermophilus	59:TAPDPRTLVSQDQNALKATEKATRSDSLGNPSSNDIYINTPLTEERRDLVRVAV 118
Aquifex aeolicus	120:HKITEEARPRVTRKREAKEMIEEL--E-GISEDEKKRALERLQNTDKYIDEINKLMEA 176
Bacillus subtilis	118:KKYAEAKAVRNRRDANDDLKKLEKNGDIEDELRASTEDVQNTDEYVSKIDSVTKD 177
Escherichia coli	118:RGEAEAKAVRNRRDANDKVKALLKKEISEDDRRSQDDVQNTDAAIKKIEAALAD 177
Haemophilus influenzae	118:KGEGEGKAVRNRRDANDKIKALLKKEISENEQHKAEIEQNTDIYIKKVDEVLD 177
Mycobacterium leprae	118:KCKGEAKVSVNRIRRVMEELHRIRKDGEGAEDEVSRKELDQNTDHYVIQIDELVKH 177
Staphylococcus aureus	117:KKIGEAKVSVNRIRRMNDOLKKDEKNGDIEDELRSGETDVQNTDINSKEIDQMIAD 176
Thermus thermophilus	119:ROYAEGRAVTRNRHEALOKLKLAKELHLSDEETKRAEAEIQNTDEFIKADQLAEK 178
Aquifex aeolicus	177:KEKEIMSV----- 184
Bacillus subtilis	178:KEKEIMEVKTMYNRKDPLMFTG 199
Escherichia coli	178:KEAELMOF----- 185
Haemophilus influenzae	178:KEKELMOF----- 185
Mycobacterium leprae	178:KEBELLEV----- 185
Staphylococcus aureus	177:KEKDIMSV----- 184
Thermus thermophilus	179:KEDEILG----- 185

【図 6】



【図 5】



【図8】

L..ICORN V2.30
 Run by: ITO 08-25-1998 01:31PM
 Result file: c:\itofldr\980825b
 Method file: rscs1

Variable settings for run

Chromatogram Questions

No 1: Sample volume and type:

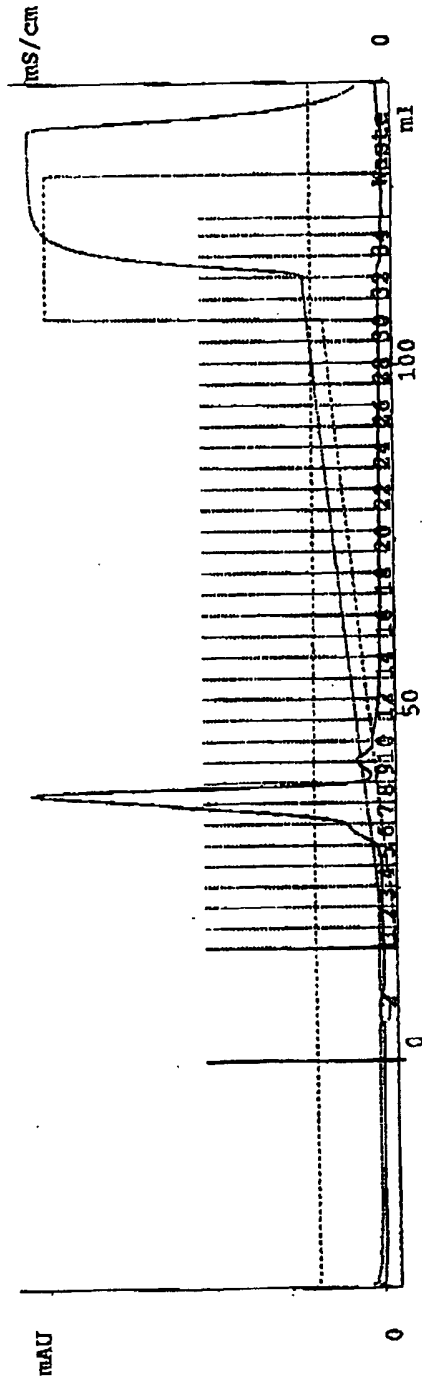
No 2: Column:

No 3: Eluent A:

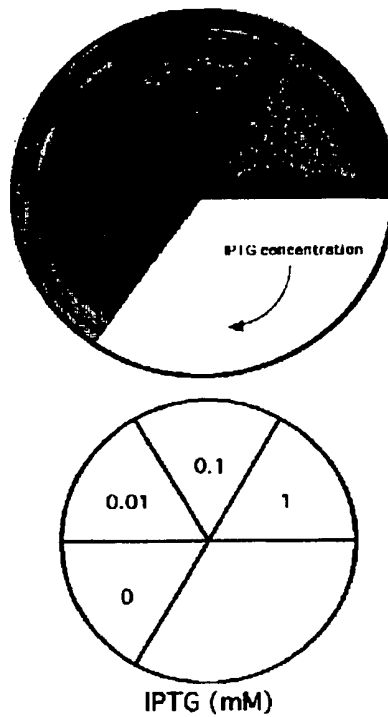
No 4: Eluent B:

No 5: Remarks

----- 980825B:1_UV1_280nm ----- 980825B:1_Conc ----- 980825B:1_pH
 980825B:1_Fractions 980825B:1_Inject



【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z
33/566		33/566	
//(C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 N 1/21			
C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:19)			

F タ-ム (参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA80 CA04
 DA06 EA04 GA11 HA01 HA11
 4B064 AG01 AG26 AG27 BA16 CA02
 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01Y AA26X AB01 BA02
 CA24 CA25 CA44 CA46
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
 CA11 DA76 DA86 EA50 FA74
 HA07